

(43)Date of publication of application : 13.06.1995

C07F 9/10
C07F 9/6571
C12N 9/00

(71)Applicant : **SAGAMI CHEM RES CENTER**

(72)Inventor : . KOBAYASHI SUSUMU

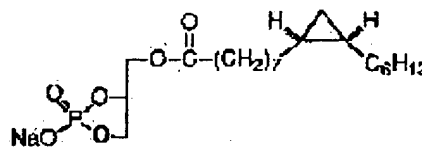
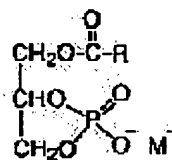
IMAI NOBUYUKI
ONIMURA KENJIRO
NAKAMURA SHIYUUKO
MUROFUSHI KIMIKO

(54) ACTIVITY PROMOTER OF PROTEIN PHOSPHORYLATED ENZYME C

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the active promoter useful for preventing and treating hypertension and hyperglycemia, having low toxicity and strong activating ability of protein phosphorylated enzyme C, comprising a compound having a specific structure as an active ingredient.

CONSTITUTION: This activity promoter comprises a 1-0-acylglycerol-2,3phosphate of formula I [R is a 1-30C straight-chain or branched alkyl or a 2-30C straight-chain or branched alkenyl; M is H, an alkaline (earth) metal or a (substituted) ammonium] as an active ingredient. For example, Na salt of 1-0-[(9S, 10R)-9,10-methanohexadecanoyl]-Sn-glycerol-2,3-phosphate may be cited as the compound of formula I.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-149772

(43) 公開日 平成7年(1995)6月13日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 F 9/10	B	9155-4H		
9/6571		9155-4H		
C 1 2 N 9/00		9359-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平5-319186

(22) 出願日 平成5年(1993)11月26日

(71) 出願人 000173762

財団法人相模中央化学研究所
東京都千代田区丸の内1丁目11番1号

(72) 発明者 小林 進

東京都目黒区中根2-2-7

(72) 発明者 今井 信行

神奈川県相模原市西大沼4-4-1

(72) 発明者 鬼村 謙二郎

神奈川県相模原市西大沼4-4-1

(72) 発明者 中村 修子

神奈川県綾瀬市小園南2-20-6

(72) 発明者 室伏 きみ子

東京都文京区大塚2-1-1 お茶の水女子大学 理学部内

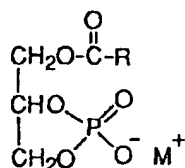
(54) 【発明の名称】 タンパク質リン酸化酵素Cの活性促進剤

(57) 【要約】

【目的】 優れた活性を有するタンパク質リン酸化酵素Cの活性促進剤を提供する。

【構成】 下記一般式

【化1】



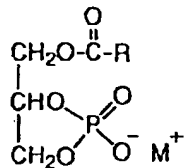
(式中、Rは炭素数1~30の直鎖状もしくは分枝状アルキル基または炭素数2~30の直鎖状もしくは分枝状アルケニル基を表わし、そのアルキル基もしくはアルケニル基はシクロアルカン環もしくは芳香環を含んでいてもよく、Mは水素原子、アルカリ金属原子もしくはアルカリ土類金属原子、または置換もしくは無置換アンモニウム基を表わす) で示される化合物を有効成分とするタンパク質リン酸化酵素Cの活性促進剤。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式

【化1】



(式中、Rは炭素数1～30の直鎖状もしくは分枝状アルキル基または炭素数2～30の直鎖状もしくは分枝状アルケニル基を表わし、そのアルキル基もしくはアルケニル基はシクロアルカン環もしくは芳香環を含んでいてもよく、Mは水素原子、アルカリ金属原子もしくはアルカリ土類金属原子、または置換もしくは無置換アンモニウム基を表わす)で示される化合物を有効成分とするタンパク質リン酸化酵素Cの活性促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生体内の種々の組織において普遍的に存在し、細胞内情報伝達や細胞周期制御に本質的に関与していると考えられているタンパク質リン酸化酵素C（以下PKCと略記する）の活性促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】PKCは生体内に普遍的に存在し、細胞内情報伝達や細胞周期制御において中心的な役割をはたしている極めて重要な酵素で、癌、免疫、炎症、高血圧、および記憶などとも関連していると考えられている。また、PKCは多くのサブタイプに分類されるが、サブタイプの種類と上記の生理学的挙動との関連、あるいはその活性化機構など不明な点が多く残されている。PKCの活性を促進する物質としては、ジアシルグリセロール（以下DGと略記する）やホルボールエステルなどがよく知られ、生化学研究の重要な試薬として供用されている。しかしながら、これらは発癌プロモーターそのものであり、PKCに関連する医薬品の開発を目指した毒性の少ない新たな活性促進剤の発見が望まれている。

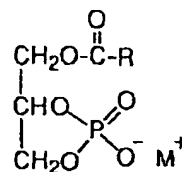
【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、毒性が低くかつ強力なPKCの活性化能を有するPKCの活性促進剤を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記の理由により、PKCの活性を促進する物質について鋭意検討したところ、毒性の低い1-0-アシルグリセロール-2,3-ホスフェートがPKCの活性を強力に促進することを見出し、本発明を完成した。

【化2】



【0007】(式中、Rは炭素数1～30の直鎖状もしくは分枝状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状もしくは分枝状アルケニル基または炭素数2～30の直鎖状もしくは分枝状アルキニル基を表わし、そのアルキル基、アルケニル基もしくはアルキニル基はシクロアルカン環もしくは芳香環を含んでいてもよく、Mは水素原子、アルカリ金属原子もしくはアルカリ土類金属原子、または置換もしくは無置換アンモニウム基を表わす)で示される化合物を有効成分とするPKCの活性促進剤に関する。

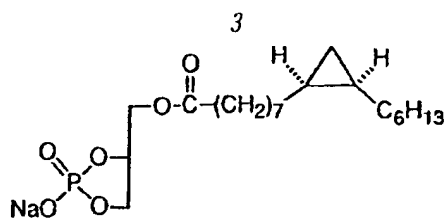
【0008】上記式中の置換基Rとしては、メチル基、エチル基、プロピル基、ヘキシル基、デシル基、ペンタデシル基、オクタデシル基などのアルキル基、アリル基、ブテニル基、オクテニル基、デセニル基、ドデカジエニル基、ヘキサデカトリエニル基などのアルケニル基、エチニル基、プロビニル基、ペンタデシニル基などのアルキニル基を例示することができる。シクロアルカン環としては、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロヘキサン環、シクロヘキセン環、シクロヘプテン環を、芳香環としては、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などを例示することができる。したがって、シクロアルカン環を含むアルキル基としては、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシルエチル基、8,9-メタノペンタデシル基など、芳香環を含むアルキル基としては、ベンジル基、フェネチル基、p-ベンチルフェニルオクチル基などを例示することができる。なお、上記のシクロアルカン環は1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、N-メチルピロリジン環などを挙げることができる。また、Mのアルカリ金属原子としてはナトリウム、カリウムなどを、アルカリ土類金属原子としてはマグネシウム、カルシウムなどを例示することができる。置換アンモニウム基としてはブチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基、テトラメチルアンモニウム基などを例示することができる。

【0009】本発明に係わる1-0-アシルグリセロール-2,3-ホスフェートの具体例としては、下記式【1】

【0010】

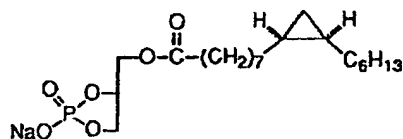
【化3】

(3)

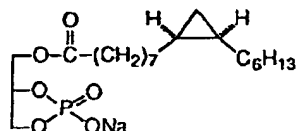


【1】

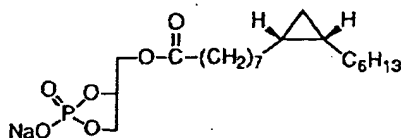
【0011】で表わされるPHYLPA (K. Murakami-Murofushi et al., J. Biol. Chem., 267, 21512 (1992).) およびその関連物質などを挙げることができ、これらの化合物は文献記載の方法 (S. Kobayashi et al., Tetrahedron Letters, 34, 4047 (1993).) により合成すること *



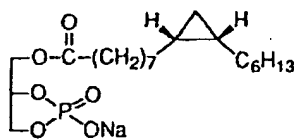
PHYLPA



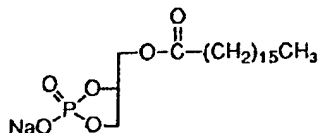
(9S,10R)-D-PHYLPA



(9R,10S)-L-PHYLPA



(9R,10S)-D-PHYLPA



Pal-PHYLPA

【0014】実施例1

20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、5mM Mg(OAc)₂、50 μM CaCl₂、50 μg/mL MBP₄₋₁₄ (I. Yasuda et al., Biochem. Biophys. Res. commun., 166, 1220 (1990).)、10 μg/mL ロイペプチン、各濃度の1-O-[(9S,10R)-9,10-メタノヘキサデカノイル]-sn-グリセロール 2,3-ホスフェートのナトリウム塩 (PHYLPA)、10 μL 精製 cPKC α (D. Schaap et al., J. Biol. Chem., 265, 7301 (1990).) および D. J. Burns et al., J. Biol. Chem., 265, 12044 (1990).) を含む溶液 40 μL を 0℃ で 1 時間処理した。この反応溶液に 10 μL ATP 溶液 (20 μM ATP, 0.5 μM

* ができる。

【0012】

【実施例】以下に、本発明に係わる1-O-アシルグリセロール-2,3-ホスフェートのPKCの活性促進作用を示す実施例を示すが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。なお、下記実施例において使用した本発明に係わる1-O-アシルグリセロール-2,3-ホスフェートの構造式を以下に示す。

【0013】

【化4】

に吸着させ、濾紙を75mMリン酸溶液で4回洗浄しフリーの[32P]ATPを除いた。濾紙を乾燥させ、液体シンチレーションカウンターによりチェレンコフ線を測定した。放射活性から被験化合物であるPHYLPAのcPKC αに対する活性化能を求めた。表1に被験化合物のcPKC α活性化能を被験化合物を添加しなかった時の相対値で表わした。

【0015】

【表1】

(4)

5
表1

PHYLPA添加量	cPKC α の活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	2.1
10 μ g/mL	5.4
20 μ g/mL	8.1

【0016】実施例2

被験化合物として3-O-[(9S, 10R)-9, 10-メタノヘキサデカノイル]-sn-グリセロール 1, 2-ホスフェートのナトリウム塩 ((9S, 10R)-D-PHYLPA) を用いた以外は実施例1と同様にして、(9S, 10R)-D-PHYLPAのcPKC α に対する活性化能を求めた。結果を表2に示す。

【0017】

【表2】

表2

(9S, 10R)-D-PHYLPA添加量	cPKC α 活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	8.1
10 μ g/mL	9.4
20 μ g/mL	9.6

【0018】実施例3被験化合物として1-O-[(9R, 10S)-9, 10-メタノヘキサデカノイル]-sn-グリセロール 2, 3-ホスフェートのナトリウム塩 ((9R, 10S)-L-PHYLPA) を用いた以外は実施例1と同様にして、(9R, 10S)-L-PHYLPAのcPKC α に対する活性化能を求めた。結果を表3に示す。

【0019】

【表3】

表3

(9R, 10S)-L-PHYLPA添加量	cPKC α 活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	2.4
10 μ g/mL	7.3
20 μ g/mL	13.9

【0020】実施例4

被験化合物として3-O-[(9R, 10S)-9, 10-メタノヘキサデカノイル]-sn-グリセロール 1, 2-ホスフェートのナトリウム塩 ((9R, 10S)-D-PHYLPA) を用いた以外は実施例1と同様にして、(9R, 10S)-D-PHYLPAのcPKC α に対する

6

【表4】

表4

(9R, 10S)-D-PHYLPA添加量	cPKC α 活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	2.1
10 μ g/mL	6.2
20 μ g/mL	11.4

【0022】実施例5被験化合物として1-O-ヘキサデカノイルグリセロール 2, 3-ホスフェートのナトリウム塩 (Pal-PHYLPA) を用いた以外は実施例1と同様にして、Pal-PHYLPAのcPKC α に対する活性化能を求めた。結果を表5に示す。

【0023】

【表5】

表5

Pal-PHYLPA添加量	cPKC α の活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	2.1
10 μ g/mL	5.5
20 μ g/mL	9.3

【0024】参考例1

被験化合物としてジアシルグリセロール (DG) を用いた以外は実施例1と同様にして、DGのcPKC α に対する活性化能を求めた。結果を表6に示す。

【0025】

【表6】

表6

DG添加量	cPKC α の活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	3.6
10 μ g/mL	7.9
20 μ g/mL	9.9

【0026】実施例6

20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、5mM Mg(OAc)₂、50 μ g/mL MBP₄₋₁₄ (I. Yasuda et al., Biochem. Biophys. Res. commun., 166, 1220 (1990).)、10 μ g/mL ロイペプチン、各濃度の1-O-[(9S, 10R)-9, 10-メタノヘキサデカノイル]-sn-グリセロール 2, 3-ホスフェートのナトリウム塩 (PHYLPA)、10 μ L 精製nPKC δ (D. Schaap

(5)

7
0).)を含む溶液40 μ Lを0℃で1時間処理した。この反応溶液に10 μ L ATP溶液 (20 μ M ATP, 0.5 μ Ci[g-³²P]ATPを含む)を加え、30℃で10分間反応させた。反応溶液40 μ Lを取り濾紙(Whatman, P81, 2x2cm)に吸着させ、濾紙を75mMリン酸溶液で4回洗浄しフリーの[³²P]ATPを除いた。濾紙を乾燥させ、液体シンチレーションカウンタによりチェレンコフ線を測定した。放射活性から被験化合物であるPHYLPAのcP K C δ に対する活性化能を求めた。表7に被験化合物のn P K C δ 活性化能を被験化合物を添加しなかった時の相対値で表わした。

【0027】

【表7】

表7

PHYLPA添加量	n P K C δ の活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	2.0
10 μ g/mL	14.8
20 μ g/mL	34.0

【0028】実施例7

被験化合物として3-O-[(9S, 10R)-9, 10-メタノヘキサデカノイル]-sn-グリセロール 1, 2-ホスフェートのナトリウム塩 ((9S, 10R)-D-PHYLPA)を用いた以外は実施例6と同様にして、(9S, 10R)-D-PHYLPAのn P K C δ に対する活性化能を求めた。結果を表8に示す。

【0029】

【表8】

表8

(9S, 10R)-D-PHYLPA添加量	n P K C δ の活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	26.8
10 μ g/mL	35.4
20 μ g/mL	39.0

【0030】実施例8

被験化合物として1-O-[(9R, 10S)-9, 10-メタノヘキサデカノイル]-sn-グリセロール 2, 3-ホスフェートのナトリウム塩 ((9R, 10S)-L-PHYLPA)を用いた以外は実施例6と同様にして、(9R, 10S)-L-PHYLPAのn P K C δ に対する活性化能を求めた。結果を表9に示す。

【0031】

【表9】

8

表9

(9R, 10S)-L-PHYLPA添加量	n P K C δ の活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	2.0
10 μ g/mL	14.8
20 μ g/mL	34.0

10 【0032】実施例9

被験化合物として3-O-[(9R, 10S)-9, 10-メタノヘキサデカノイル]-sn-グリセロール 1, 2-ホスフェートのナトリウム塩 ((9R, 10S)-D-PHYLPA)を用いた以外は実施例6と同様にして、(9R, 10S)-D-PHYLPAのn P K C δ に対する活性化能を求めた。結果を表10に示す。

【0033】

【表10】

表10

(9R, 10S)-D-PHYLPA添加量	n P K C δ の活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	3.1
10 μ g/mL	17.5
20 μ g/mL	34.0

【0034】実施例10

被験化合物として1-O-ヘキサデカノイルグリセロール 2, 3-ホスフェートのナトリウム塩 (Pal-PHYLPA)を用いた以外は実施例6と同様にして、Pal-PHYLPAのn P K C δ に対する活性化能を求めた。結果を表11に示す。

【0035】

【表11】

表11

Pal-PHYLPA添加量	n P K C δ の活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	13.2
10 μ g/mL	28.6
20 μ g/mL	34.0

【0036】参考例2

被験化合物としてジアシルグリセロール (DG)を用いた以外は実施例6と同様にして、DGのn P K C δ に対する活性化能を求めた。結果を表12に示す。

【0037】

【表12】

9
表12

DG添加量	nPKC δ の活性化能
無添加	1.0
4 μ g/mL	6.9
10 μ g/mL	25.0
20 μ g/mL	32.0

【0038】

(6)

10

【発明の効果】1-0-アシルグリセロール-2,3-ホスフェートは低濃度（数 μ g/mL）では細胞の生存には何ら悪い影響を与えないにも拘わらず（K. Murakami-Murofushi et al., J. Biol. Chem., 267, 21512 (1992).）、DGと同等もしくはそれ以上強力にPKCを活性化することから、これらの物質は高血圧症、高血糖症、痴呆症の予防もしくは治療に有用と考えられるほか、PKCを介する情報伝達系の解析や、種々の生理的な実験系において有用な薬剤として利用しうる。

10